

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**This Page Blank (uspto)**

(19) [logo] European Patent Office

(11) Publicn. No. 0 421 021 A1

(12)

## EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Appl. No.: 89118625.6

(51) Int. Cl<sup>5</sup>. A 61 K 37/54

(22) Appl. date: 10/06/1989

(43) Date of publicn. of applicn:  
04/10/1991 Patent Bulletin 91/15

(84) Designated contracting states:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LU NL SE

(71) Applicant: MUCOS  
EMULSIONSGESELLSCHAFT mbH  
Mirastrasse 17  
W-1000 Berlin 27(DE)

(72) Inventor: Ransberger, Karl  
Gabriel-von-Seidl-Strasse 62, W-8022  
Grunwald (DE)  
Inventor: Stauder, Gerhard  
Kathi-Kobus-Steig 1  
W-8190 Wolfratshausen (DE)

(74) Representative: Patent Attorneys  
Grunecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Partner  
Maximilianstrasse 58  
W-8000 Munich 22 (DE)

(54) Use of catabolic enzymes for the activation of macrophages and/or NK cells, a medication containing this enzyme, and macrophages and/or NK cells activated by this enzyme.

(57) The invention relates to the use of one of the enzymes pancreatin, bromelain, papain, lipase, amylase, trypsin and/or chymotrypsin for the activation of macrophages and/or NK cells, enzymatically activate macrophages and/or NK cells, as well as a medication for the activation of macrophages and/or NK cells.

**This Page Blank (uspto)**

**USE OF CATABOLIC ENZYMES FOR THE ACTIVATION OF MACROPHAGES AND/OR NK CELLS, A MEDICATION CONTAINING THIS ENZYME, AND MACROPHAGES AND/OR NK CELLS ACTIVATED BY THIS ENZYME.**

The present invention relates to the use of the enzymes pancreatin, bromelain, papain, lipase, amylase, trypsin and/or chymotrypsin for the activation of macrophages and/or NK cells, enzymatically activated macrophages and/or NK cells, as well as a medication for the activation of macrophages and/or NK cells.

Designated as macrophages are mononuclear phagocytes (monocytes), which belong to the phagocytosing leucocytes.

NK ("natural killer") cells represent a sub-population of the lymphocytes.

Macrophages and NK cells have an important function in the immunological surveillance both of tumor cells and also of infections. Thus it has long been known that activated macrophages and NK cells can destroy a whole series of different tumor cells in non-specific ways in vitro and in vivo. The activation of the tumoricidal effector cells (macrophages, NK cells), can be raised with lymphokines such as interferon and other immunostimulants. Using large scale and expensive methods, interferons are either isolated from cell cultures or synthesized by means of genetic engineering methods.

The present invention is based on the problem of providing an economical, effective activator of the tumoricidal potential of effector cells (macrophages, NK cells), as well as enzymatically activated effector cells and a medication for the activation of effector cells.

This problem is solved in accordance with the invention by the fact that at least one of the enzymes pancreatin, bromelain, papain, lipase, amylase, trypsin and/or chymotrypsin is used for the activation of macrophages and/or NK cells.

It has surprisingly been shown that the enzymes pancreatin, bromelain, papain, lipase, amylase, trypsin and/or chymotrypsin can activate macrophages and/or NK cells highly effectively and in an extremely short time (within 5-10 minutes).

The enzymes used in accordance with the invention can be isolated economically from the following raw materials.

Pancreatin is obtained from pig or cattle pancreas.

Bromelain is a proteolytically active enzyme from the pressed juice of the pineapple.

Papain is a proteolytic enzyme that is obtained from the milky juice of the unripe, fleshy fruits of the pawpaw, *Carica papaya*.

Lipases belong to an esterase sub-group and are obtained from the pancreas or the fungus *Rhizopus arrhizus*.

Amylases are glycoside-splitting enzymes that are for example isolated from the pancreas or specific microorganisms.

This Page Blank (uspto)

Trypsin and chymotrypsin are proteolytic enzymes that are also formed in the pancreas and have already been used therapeutically in combination with other enzymes.

Triacylglycerol lipases are preferably used as the lipases, and/or the amylase is  $\alpha$ -amylase. These display good activity as activators of the tumoricidal potential of macrophages and/or NK cells.

A particular efficacy is shown when a combination of the enzymes pancreatin, bromelain, papain, triacylglycerol lipase,  $\alpha$ -amylase, trypsin and/or chymotrypsin is used. Besides the remarkable and unexpected effect of these enzymes on the activation of the tumoricidal potential of macrophages and/or NK cells, the use in combination of the enzymes cited also shows a synergistic effect.

Furthermore, rutoside, a glycoside belonging to the flavonoids, can preferably be used in addition.

The use in combination of 50-200 mg, preferably 100 mg pancreatin, 20-100 mg, preferably 45 mg bromelain, 40-100 mg, preferably 60 mg papain, 5-50 mg, preferably 10 mg triacylglycerol lipase, 5-50 mg, preferably 10 mg  $\alpha$ -amylase, 10-30 mg, preferably 24 mg trypsin, 1-10 mg, preferably 1 mg chymotrypsin and 10-100 mg, preferably 50 mg rutoside.  $3H_2O$  per dose unit has a particularly good tolerance and efficacy.

Further, the preparations to be used can in addition contain Serratia peptidase. Serratia peptidase can be obtained from a microorganism of the Serratia genus.

In a particularly preferred form of execution, polyethylene glycol (PEG) and/or polyvinylpyrrolidone (PVP) are used in addition. In this way, the activity of effector cells can be additionally raised.

The preparation utilized can also contain the usual adjuvants and/or carriers.

The enzymatically activated macrophages and/or NK cells obtained by treating the effector cells with at least one of the enzymes pancreatin, bromelain, papain, lipase, amylase, trypsin and/or chymotrypsin can be injected into the patient for the treatment of tumors. It has surprisingly been demonstrated that the enzymatically activated state of the effector cells is preserved after freezing and later thawing. It is of advantage here if the enzymatically treated effector cells can regenerate for at least 20 minutes, preferably at least 30 minutes, before freezing or injection.

The examples illustrate the invention.

### I. Activation of macrophages

In the study of the effect of enzymes and enzyme mixtures on the activity of macrophages, the following parameters were determined:

- a) (PR%) Relative phagocytosis rate (in %) designates the phagocytosed percentage fraction of the target cells, i.e. of the  $^{51}Cr$  labeled sheep erythrocytes (SRBC), present in the selected standardized test arrangement of macrophages/monocytes.

The calculation in the  $^{51}Cr$  phagocytosis test - in far-reaching analogy to the calculation of the specific lysis in the  $^{51}Cr$ -release cytotoxicity test - is carried out using the formula:

Relative phagocytosis rate (in %)

$$= \frac{\text{cpm (sample)} - \text{cpm (negative control)}}{\text{cpm (total)} - \text{cpm (blank)}}$$

This Page Blank (uspto)

- b) (dPR %) Relative increase in the phagocytosis rate (in %) designates the percentage rise in the phagocytosis rate due to enzymatically pretreated monocytes/macrophages relative to untreated monocytes/macrophages.
- c) (PI) Phagocytosis index designates the phagocytized fraction of target cells ( $^{51}\text{Cr}$ -labeled SRBC) per 100 monocytes/macrophages in a sample (well in the 96-well microtitration plate).

For the calculation of the phagocytosis index, in addition to the phagocytosis rate, the number of SRBC in a sample well and the number of monocytes/macrophages in this well, or at least the ratio of SRBC to monocytes/macrophages, i.e. of target (T-) and Effector (E-) cells must be known. Then it holds that:

$$\text{PI} = \frac{\text{T}/\text{E} \times \text{PR} \% \times 100}{\frac{\text{number of SRBC per well}}{\text{number of macrophages per well}}} \times \text{PR} \% \times 100$$

- d) (dPI) Change in the phagocytosis index designates the number of SRBC in a sample that are phagocytized more (or less) per 100 monocytes on the average, if the monocytes were pretreated with enzymes, measured as that number of SRBC phagocytized by 100 monocytes in the base medium (without enzyme).

$$\text{dPI} = \text{PI} (\text{pretreated}) - \text{PI} (\text{untreated})$$

- e) (f) phagocytosis change factor designates the quotient of the phagocytosis rates of pretreated and untreated samples.

$$f = \frac{\text{PR} \% (\text{pretreated})}{\text{PR} \% (\text{untreated})} = \frac{\text{cpm} (\text{pretreated}) - \text{cpm} (\text{negative control})}{\text{cpm} (\text{untreated}) - \text{cpm} (\text{negative control})}$$

### 1. Activation of macrophages by an enzyme mixture (Wobenzyme)

Wobenzyme is an enzyme mixture with the following composition (parts by weight): pancreatin (100), bromelain (45), papain (60), triacylglycerol lipase (10),  $\alpha$ -amylase (10), trypsin (24) and chymotrypsin (1). In addition, the enzyme mixture also contains 50 parts by weight rutoside. $3\text{H}_2\text{O}$ .

#### a) Tenfold plasma concentration ( $10 \times C_{\text{PI}}$ )

Test series I (test conditions: recovery time: 30 min, enzyme action duration: 10 min, pre-centrifuging (PC): 3 min/50 g, E:T ratio: 1:1-20).

The average PR % value for samples without enzyme treatment was 10.3 and for samples with enzymatic pretreatment 14.7. The corresponding PI values were 92.5 and 129.4. Thus the macrophage pretreatment with Wobenzyme brought an average improvement in the PI value of 36.9. The f value was 2.21.

Test series II (test conditions as for test series I, except E:T = 1:20-40).

Here, the PR % value of untreated samples was 2.8 and that of the enzyme pretreated samples 7.6. Corresponding PI values were 95.2 and 258.4. Correspondingly, the dPI value was raised by 163.2. The f value was 2.75.

This Page Blank (uspto)

Test Series III (Test conditions as in test series I, but E:T = 1:40).

The untreated samples displayed a PR % factor of 2.4, the enzyme-treated samples one of 4.6, and the corresponding PI values were calculated at 161.7 and 282.9. Thus the Wobenzyme treatment brought an increase in the dPI of 121.2. The f-value amounted to 1.75 on the average.

b) Single plasma concentration ( $C_{Pl}$ )

Test series I (Test conditions: recovery time: 30 min, enzyme action duration: 10 min, precentrifuging (PC): 5 min/50 g - 3 min/80 g, E:T ratio: 1:1 - 1:40, tz.v = 90 [meaning of tz.v unknown- Translator]).

The PR % value after repeating the same test 6 times was on the average 4.4 compared with 2.5 in the absence of enzymes. The corresponding PI values were 138.8 and 111.3. Thus the pre-treatment of the macrophages with Wobenzyme led to an average rise in the dPI of 27.5.

Test series II (Test conditions: as in test series I, but tz.v = 150).

The tests, repeated 7 times, gave for the enzyme pretreatment of the macrophages an average PR % value of 13.2 and an average PI value of 390.6. The corresponding averages for untreated samples were 10.8 and 271.0. The average rise in dPI after enzyme treatment was 119.6, the f index 1.53.

Test series III (Test conditions: as in Test series I, but tz.v = 250).

The result for five individual experiments showed that Wobenzyme allowed the dPI index to rise by an average of 17.4. The PI values of untreated samples were on the average 524.5 and of enzymatically pretreated samples 541.9. The corresponding PR % values were 19.0 and 19.7.

The activity of the macrophages could be raised further if PEG and/or PVP was added to the culture medium in addition to the Wobenzyme.

#### Test series IV

In a test series consisting of 6 individual tests, an average dPI increase of 148.9 could be observed as a result of the rise in the PI from 134.5 to 283.4 after combined Wobenzyme/PEG-PVP pre-treatment. The PR % value after the combined Wobenzyme/PEG-PVP pretreatment rose from 3.8 to 7.9.

#### Test series V

After a test series consisting of 9 individual tests, in which macrophages were pretreated in part with Wobenzyme alone, in part with the combination of PEG-PVP and Wobenzyme, the PI value rose by an average of 108.7.

#### Test series VI

In another test series composed of 18 individual tests, the macrophage pre-treatment with proteases and lipases of the enzyme preparation Wobenzyme ( $C_{Pl}$ ) could effectuate an average increase in dPI of 60.2. The average PI value for the untreated samples was 288.2 and that for the enzyme-treated samples 348.4. The corresponding PR % values were 12.8 and 9.9.

The statistical processing of the PR %, PI, dPI and f values obtained in 48 individual tests with 3-4 parallels each, in a few cases 2 parallels, showed that the pre-treatment of the

**This Page Blank (uspto)**

monocytes/macrophages with Wobenzyme alone ( $C_{PI}$ ) or with the combination of Wobenzyme ( $C_{PI}$ ) and PEG-PVP (2-20 g/l PEG of MW 6000 D and 1-10 g/l PVP of MW 40,000 D and  $1 \times 10^{-3}$  -  $1 \times 10^{-4}$  g/l PVP of MW 360,000 D) leads to an average increase in PR % of 8.4 (for untreated samples) to 11.5 (after macrophage treatment). The corresponding average PI values were 238.1 (for untreated samples) and 319.8 (for pretreated samples). The dPI values were on the average 81.5, and the f value was 1.90.

## 2. The efficacy of hydrolases (Wobenzyme) used in combination with PEG and PVP

In 2 parallel test series in each case, (test series XI-XIV), under otherwise constant test conditions, the efficacy of the macrophage pre-treatment with Wobenzyme alone ( $C_{PI}$ ) was compared with that after combined, i.e. PEG-PVP-assisted, enzymatic pre-treatment of macrophages.

The first two parallel test series (test series XI and XII) differed from the other two (test series XIII and XIV) only in that tz.v in the former case was 150 and in the latter case 250. The other test conditions were constant (E-T precentrifuging: 5 min/50 g, regeneration time: 30 min).

A direct comparison of the PR %, PI and dPI values between test series XI and XII (tz.v = 150) as well as between test series XIII and XIV (tz.v = 250) conveyed a picture of the potentiating effect of PEG and PVP on the activation of monocytes/macrophages by hydrolases (Wobenzyme).

Thus the average PI value rose for treatment with Wobenzyme alone from 271.0 (untreated) to 390.6 (treated), corresponding to a dPI value of 119.6, while the corresponding PI value for combined macrophage pre-treatment "jumped" from 224.4 to 517.0, which corresponds to a dPI value of 292.6.

The PR % value increased for treatment with Wobenzyme alone from 10.8 (untreated) to 15.2 (treated); for combined pre-treatment it changed from 5.1 to 11.7.

These results are based on tz.v = 150 (test series XI and XII). With tz.v = 250 (test series XIII and XIV), the comparison between single and combined Wobenzyme pre-treatment proved to be as follows:

The average PI value for treatment with Wobenzyme alone rose [sic] from 524.5 (untreated) to 514.9 (treated), corresponding to a dPI value of 17.3 [sic]. For the pre-treatment combined with PEG and PVP on the other hand, the dPI value rose by 134.8 units (from 173.2 to 308.1). The PR % values in the absence of PEG and PVP rose from 19.0 to 19.7, and in their presence from 6.4 to 11.5.

## 3. Activation of the macrophages by trypsin ( $C_{PI}$ )

The test conditions corresponded to those with Wobenzyme (recovery time: 30 min, enzyme action time: 10 min, pre-centrifuging: 3 min /50 g). The main variation was in the ratio between effector cells (macrophages) and target cells ( $^{51}\text{Cr}$ -labeled SRBC), i.e. the E:T ratio.

## 4. E:T ratio: 1:1-10

The PR % value, i.e. the "relative phagocytosis rate" (in %) was changed on the average from 11.1 to 13.4 as a result of the pre-treatment of the macrophages with trypsin ( $C_{PI}$ ).

The PI value, i.e. the total phagocytosed number of SRBC per 100 monocytes in a sample, rose in the same time from 92.5 to 111.9. The dPI value thus rose by 19.5 units. The f factor, corresponding to the quotient of the phagocytosis rates of the treated and untreated samples, was 1.43.

This Page Blank (uspto)

E:T ratio 1:10-20

Trypsin treatment of the macrophages led to a rise in the "relative phagocytosis rate" (PR %) from 17.9 to 24.2 and to an increase in the phagocytosis index (PI) from 233.3 (untreated) to 316.1 (treated).

The dPI value showed an average value of 82.8 and the phagocytosis change factor f showed an average value of 1.32.

E:T ratio: 1:40-80

This complex including 7 individual tests with 26 parallels showed the following trends: PR % rose from 4.76 to 5.3 and PI from 204.9 to 225.5. The phagocytosis index changed by 20.6 and the f factor showed a value of 1.24 on the average.

E:T ratio: 1:80

The test, carried out 4 times (with 15 parallels), showed a similar trend to the test series above: PR % rose moderately from 3.1 to 3.7 after trypsin treatment. In the same time, the phagocytosis index was raised from 275.1 (without pre-treatment) to 325.5. The f factor was 1.19, the average dPI index 50.4.

E:T ratio: 1:1-80

The combination of 18 tests (with 68 parallels) without more detailed specification of the E:T ratios resulted in a rise in the average PR % value from 8.0 (before treatment) to 9.9 (after treatment), a PI increase from 200.3 to 237.6 and an average value for dPI of 37.2 and for f of 1.28.

5. Observance of a required regeneration time of at least 20, preferably 30 minutes in the in vitro activation of macrophages by hydrolases, demonstrated in the example of trypsin ( $C_{PI}$ )

In the following test, the observance or nonobservance of a regeneration time of 30 min after enzyme treatment was investigated. If no regeneration time was observed, then the average "relative phagocytosis rate" (PR %) fell from 8.3 to 7.9. Also, the averaged PI decreased from 252.7 to 219.2. Thus the dPI was negative (-33.5) and the f factor was 0.86. When however, under test conditions that were otherwise the same, a regeneration time of 30 min was observed, there was on the contrary a change in the PR % after trypsin treatment from 7.9 to 9.9, the PI went from 200.2 to 237.6, the dPI displayed an average value of 37.3 and the f factor was 1.28.

6. Macrophage activation by papain

Two papain concentrations were tested, the  $C_{PI}$  and ten times that concentration. In the first test series, papain was investigated in the  $C_{PI}$  concentration. The papain-pretreated macrophages displayed a PR % average value of 11.3 and an average PI value of 165.9. The untreated macrophages, on the other hand, displayed a lower PR % average value of 7.5 and an average PI value of 164.6.

The tenfold higher concentration of papain effectuated a PR % rise from 2.9 to 5.4 and a PI shift from 139.0 to 265.3. The average dPI value was 196.2 [sic] and the f average 1.85.

**This Page Blank (uspto)**

### 7. Activation of the effector cells (macrophages) by lipase

The test conditions were the same as for the other enzymes. In a test series consisting of 8 individual tests (with 29 parallels), the pre-treatment of the macrophages with the therapeutically obtainable lipase concentration ( $C_{PL}$ ) resulted in a rise in the phagocytic activity of the macrophages that was expressed in the following (averaged) indexes: the relative phagocytosis rate (PR %) rose from 10.3 for untreated samples to 12.3 for samples pretreated with lipase. The phagocytosis index (PI) was raised from 258.8 to 316.8 units. The dPI average value was calculated at 58.0 and the f average was 1.24 on the average.

In another series of 8 individual tests, in which the lipase was sometimes also combined with PEG (MW 6000 D, 40 g/l) and PVP (MW 360,000 D, 0.1 - 10 mg/l), the relative phagocytosis rate after enzyme treatment was raised from 16.6 to 20.4 and the phagocytosis index from 329.9 to 411.2. The corresponding dPI average value was 59.0 [sic] and the averaged f value 1.24.

The combined representation of 26 individual tests (with 76 parallels) gave on the average a PR % rise from 10.1 to 12.8 (in the extreme case from 3.0 to 13.2) and an average PI increase from 230.1 to 296.3 (in the extreme case from 75.0 to 330.0). The dPI average value was 66.3 (maximum value: 255.0) and the f average 1.35 (maximum value: 4.37).

### 8. Synergism of the individual hydrolases (proteases and lipases)

Surprisingly, a synergistic effect of the hydrolase mixture Wobenzyme was found. Below, the effect of individual representatives of the animal and plant proteases as well as lipase was contrasted with the effect of the enzyme preparation.

#### a) Comparison of trypsin ( $C_{PL}$ ) with the enzyme preparation ( $C_{PL}$ )

In a test series encompassing 13 individual tests, it was shown that the average PR % value for Wobenzyme (10.2) was higher by 1.8 than for trypsin (8.4), and their ratio was 1.2.

The PI index for Wobenzyme (274.0) was 49.7 units higher than for trypsin (224.3). In the extreme case, the PR % values differed by 8.1 and the PI index by 281.6 units in favor of the Wobenzyme.

#### b) Comparison of chymotrypsin with the enzyme mixture

A test series based on 9 individual tests led to the following result:

The average value of the "relative phagocytosis rate" for Wobenzyme (12.2) was 2.4 units higher than for chymotrypsin (9.8); the "phagocytosis index" for Wobenzyme (264.0) showed a 24.8 units higher average value than for chymotrypsin (239.2). The ratio of the two PR % values was 1.26 in favor of the Wobenzyme.

In the extreme case, the PR % values differed by 13.1 and the PI values by 170.3 in favor of the enzyme mixture.

#### c) Comparison of papain with the enzyme mixture

In this comparison, also, Wobenzyme displayed a higher PR % activity than papain (19.5 versus 14.8).

The PI values were also higher for Wobenzyme (311.2 versus 269.0).

**This Page Blank (uspto)**

d) Comparison of lipase with the enzyme mixture

In a test series encompassing 5 individual tests, Wobenzyme, with a PR % average value of 11.5 displayed a 2.5-unit higher phagocytosis-raising activity than lipase (9.0). The same holds for the average PI values (292.3 versus 275.6).

The simultaneous investigation of (a) trypsin, (b) chymotrypsin, and (c) Wobenzyme (all: C<sub>PI</sub>) in a test series consisting of 9 individual tests resulted in the following averages for the activity-relevant indexes PR % , PI and f:

- (a) trypsin: PR % 10.2, PI 215.1 and f 1.37
- (b) chymotrypsin: PR % 9.9, PI 239.2, and f 1.46, and
- (c) Wobenzyme: PR % 12.2, PI 264.0 and f 1.74.

The corresponding average PR % and PI values of the untreated reference samples were 7.9 and 171.9 (f 1.0).

II. Increasing the activity of NK cells by hydrolases (proteolytic enzymes of animal and plant origin, lipase)

The cytotoxic/cytolytic activity of NK cells was determined quantitatively in the <sup>51</sup>Cr release test. K562 lymphoma cells served as target cells (T); they are particularly sensitive and to some extent selective for (activated) NK cells.

The parameters measured are illustrated below:

a) (LR %) Lysis rate designates mathematically the percentage cytotoxicity and is calculated by the following formula:

$$LR = \frac{\text{cpm (sample)} - \text{cpm (negative control)}}{\text{cpm (total)} - \text{cpm (negative control)}} \times 100 (\%)$$

b) (LI %) Lysis index designates the number of K562 cells in % that are lysed by 100 NK cells in each case.

$$LI = \frac{\text{number of K562* - cells (sample)}}{\text{number of NK cells (sample)}} \times \text{lysis rate (in \%)} \times 100$$

[\* typo in original]

c) (dLR) Change in lysis rate designates the difference in the lysis rates (LR) between enzyme-treated and untreated samples. The reference value is thus the NK activity in the base medium, i.e. without enzyme and/or addition of PEG-PVP.

1. NK activation with observance of a regeneration time

The pretreatment of NK cells (10 min at 37°C) with the enzyme mixture (Wobenzyme) at the therapeutically obtainable plasma concentration (C<sub>PI</sub>) showed in different test subjects greatly differing absolute values for the "lysis rate" (LR), for the lysis index (LI) as well as for the change in lysis rate after enzyme treatment (dLR); the trend to enzyme-mediated NK activation is however clearly marked.

This Page Blank (uspto)

In a test series consisting of 26 individual tests, only in one case was a decrease in activity shown after Wobenzyme treatment.

In order to convey a more precise picture, above all with regard to the considerable inter-individual deviations, the LR, LI and dLR values of this representative test series are specified separately. Thus the LR value changed from test subject to test subject corresponding to the pairs of numbers to the left and right of the slash (left: untreated samples, right: enzyme pretreated samples): 3.0/3.5; 3.0/4.9; 3.1/20.0; 3.1/47.4; 6.2/8.0; 6.2/8.9; 12.3/13.4; 12.3/36.1; 14.1/16.5; 14.1/42.4; 2.9/11.0; 8.5/12.1; 10.4/19.3; 20.8/21.3; 30.2/44.6; 25.2/26.5; 0.9/12.6; 5.7/31.3; 7.8/25.2; 18.4/25.5; 25.7/37.0; 25.1/25.5; 19.2/17.7; 22.1/23.6; 23.7/24.1; 23.1/24.3.

The corresponding LI values changed from test subject to test subject as follows: (left: untreated, right: enzyme pretreated): 60/71; 60/98; 62/401; 62/948; 124/160; 124/178; 246/267; 246/721; 282/330; 282/849; 57/219; 170/241; 207/387; 416/425; 603/892; 503/530; 17/252; 115/626; 157/505; 368/511; 514/739; 502/513; 384/354; 442/473; 474/482; 462/485.

The dLI values [sic] calculated from this were: 11; 38; 339; 886; 36; 54; 21; 475; 48; 567; 162; 71; 180; 9; 289; 27; 235; 511; 348; 143; 225; 11; 31; 8; 23.

## 2. Treatment of the NK cells with the enzyme mixture Wobenzyme without observance of a regeneration time

The values become mostly negative in these studies. LR varied from 0.7/3.3-18.7/7.2, the values for LI were between 14/67 and 431/233, and for the dLI between 53 and -229. The results make clear the importance of a regeneration time for the cells.

## 3. Activation of the NK cells with trypsin

Trypsin proves to be one of the most active components of the hydrolase mixture. In order to show the clear effect, but also the great inter-individual deviations that involve both the base activity and also the enzyme-mediated activatability of the NK cells, the results of a test series consisting of 28 individual tests are listed separately. As above with Wobenzyme, the LR, LI and dLI values are reproduced. Here, too, the number to the left of the slash stands for the untreated samples and that to the right of this slash for the enzyme pretreated samples.

The LR values were: 7.6/12.8; 3.0/3.6; 7.6/18.8; 3.0/7.6; 3.1/32.6; 6.2/12.4; 3.1/32.6; 6.2/12.4; 12.3/25.9; 6.2/12.9; 12.3/26.4; 14.1/36.3; 17.3/17.8; 14.1/37.6; 25.4/27.1; 21.3/22.9; 22.8/23.8; 25.3/27.8; 22.6/26.6; 42.2/26.6; 30.3/31.9; 13.0/17.5; 20.0/24.1; 20.6/26.4; 24.5/21.4; 30.4/32.3; 23.3/27.1; 27.5/30.9; 26.6/31.8.

The corresponding LI values varied from test subject to test subject as follows: 155/256; 60/72; 155/377; 60/152; 62/651; 124/249; 62/239; 124/259; 246/517; 282/727; 246/538; 282/752; 345/355; 508/542; 425/458; 455/476; 505/556; 452/533; 483/533; 605/637; 260/350; 404/483; 413/527; 490/429; 608/646; 456/541; 549/619; 532/635.

The dLI values had the following values: 101; 12; 222; 92; 589; 125; 177; 135; 271; 445; 292; 470; 10; 34; 33; 21; 51; 81; 50; 32; 90; 79; 114; 61; 38; 76; 70; 70; 103.

## 4. Effect of chymotrypsin on the activity of NK cells

With chymotrypsin, too, the same effect was shown as with Wobenzyme and trypsin. An increase in the NK activity was always shown, as long as the required recovery time was observed directly after the enzyme treatment.

**This Page Blank (uspto)**

In a typical experiment, based on 6 individual tests, the pairs of values for the "lysis rate" (LR) varied between 6.2/9.2 and 3.1/17.5, those for the "lysis index\*" (LI\*) between 124/185 and 62/349, and for the dLI\* values between 61 and 287.

[\* typos in original]

##### 5. Increasing the NK activity with papain

A clear increase in activity was also shown with NK cells that had been pretreated with the plant protease papain.

This is demonstrated in the example of a representative test series based on 8 individual tests.

The LR value pairs varied from test subject to test subject from 0.7/1.9 to 14.1/45.7, the corresponding LI value pairs were between 14/37 and 282/915, and the dLI values were scattered between 23 and 633.

##### 6. Raising the activity of NK cells with lipase

The influence of the lipase contained in the Wobenzyme on the NK activity is demonstrated in the example of a test series consisting of 32 individual tests. It was shown that there is a clear effect on the activity of NK cells, but that the inter-individual deviations both in the base activity and also in the lipase-mediated activation of NK cells are significant. Only in 3 of 32 cases were there negative values for the dLI.

The subdivision according to the activation indexes LR, LI and dLI, as well as the way of writing the LR and LI pairs of values (left: untreated, right: pretreated with lipase), correspond to those for the enzymes discussed above.

LR ("lysis rate"): 2.2/3.1; 5.7/7.1; 4.6/7.1; 4.3/5.5; 2.4/7.3; 5.9/7.2; 7.1/7.2; 5.7/6.4; 4.3/9.6; 1.9/1.4; 5.2/6.4; 3.4/5.4; 4.7/5.2; 4.2/7.0; 5.8/.5; 6.5/6.5; 6.1/7.5; 7.0/11.0; 19.2/17.0; 22.1/23.6; 23.7/24.1; 23.1/23.4; 6.2/8.4; 6.2/7.1; 12.3/26.3; 12.3/26.0; 14.1/38.2; 14.1/39.7; 14.7/15.1; 18.7/19.4; 21.6/13.9; 19.6/20.1.

LI ("lysis index"): 43/62; 115/142; 93/142; 86/109; 48/147; 118/145; 143/144; 114/128; 86/191; 38/29; 105/128; 68/109; 94/104; 83/139; 116/150; 129/131; 150/122; 140/221; 384/340; 442/471; 474/481; 462/469; 124/167; 124/142; 246/527; 246/521; 282/763; 282/793; 301/293; 373/387; 431/278; 401/393.

dLI [sic] ("change in rate of lysis" [sic]): 19; 27; 49; 23; 99; 27; 1; 14; 105; -9; 23; 41; 10; 56; 34; 2; 28; 81; -44; 29; 7; 43; 18; 281; 275; 481; 511; 8; 14; -153; 8.

III. For the injection into the tumor patient of the enzymatically activated effector cells obtained in vitro, the stability of the tumoricidal state of these cells is of particular importance. It has surprisingly been found that the activated tumoricidal state of the effector cells obtained by enzymatic treatment is preserved after the freezing and later thawing of the latter.

The two polymers PEG and PVP were used as the cryoprotectants for the freezing of the enzymatically activated effector cells. In these tests, PEG of MW 6000 D and PVP with MW 40,000 D and 360,000 D in a final concentration [typo in original] of 40 g/l is added to an 8-15% DMSO solution in RPM I 1640 medium.

**This Page Blank (uspto)**

As can be seen from the indexes listed below, with this mixture the enzyme-induced macrophage activation is preserved even after the freezing and thawing of the macrophages.

The test conditions were: Wobenzyme ( $C_P$ ), Enzyme action time: 10 min, recovery time: 30 min.

The activities measured after the thawing of the frozen enzyme-pretreated macrophage suspensions clearly show that the effector cell activation is not lost by freezing the cells. Thus the samples frozen combined with the cryoprotective mixture composed of DMSO (8-15%) and PEG (MW 6000 D, 40 g/l) showed PR % values of 4.4 - 9.7, while the reference values were between 2.2 and 6.1 (PR % comparison values: 9.7/2.2, 4.4/2.6, 8.6/6.1, 6.9/2.8). The PI values varied between 132.0 and 291.0, the reference values between 66.0 and 146.4 (PI values: 291.0/66.0, 132.0/78.0, 206.4/146.4, 200.1/81.2).

The corresponding dPR values were between 41.0 and 340.7, the dPI values between 54.0 and 225.0. The good preservation of the macrophage activity was also shown in the f value which was between 1.41 and 4.41. The combination of the conventional cryoprotectant DMSO with PVP proved to be very successful in the preservation of the macrophage activity, as could also be deduced from the comparison of the PR % value pairs 5.9/2.8 and 8.7/2.1 for PVP of MW 40,000 D and 4.2/1.8 and 12.0/6.6 for PVP of MW 360,000 D.

The same result is also shown for the PI value pairs (141.6/67.2 and 60.9/252.3 for MW 40,000 D and 196.0/54.0 and 300.0/165.0 for MW 360,000 D), as well as for the f values (2.12 and 4.15 for MW 40,000 D or 2.34 and 1.80 for MW 360,000 D).

## Claims

1. Use of at least one of the enzymes pancreatin, bromelain, papain, lipase, amylase, trypsin and/or chymotrypsin for the activation of macrophages and/or NK cells.
2. Use as in claim 1,  
characterized by the fact that  
triacylglycerol lipase is used as the lipase.
3. Use as in claim 1,  
characterized by the fact that  
 $\alpha$ -amylase is used as the amylase.
4. Use as in claim 1,  
characterized by the fact that  
a combination of the enzymes pancreatin, bromelain, papain, triacylglycerol lipase,  $\alpha$ -amylase, trypsin and/or chymotrypsin is used.
5. Use as in one of the claims 1-4,  
characterized by the fact that  
rutoside is used in addition.
6. Use as in claim 5,  
characterized by the fact that  
50-200 mg, preferably 100 mg pancreatin, 20-100 mg, preferably 45 mg bromelain, 40-100 mg, preferably 60 mg papain, 5-50 mg, preferably 10 mg triglycerol lipase, 5-50 mg, preferably 10 mg  $\alpha$ -amylase, 10-30 mg, preferably 24 mg trypsin, 1-10 mg, preferably 1 mg chymotrypsin, and 10-100 mg, preferably 50 mg rutoside. $3H_2O$ , are used per dosage unit.

**This Page Blank (uspto)**

7. Use as in at least one of the claims 1-6,  
characterized by the fact that  
in addition Serratia peptidase is used.
8. Use as in at least one of the claims 1-7,  
characterized by the fact that  
in addition PEG and/or PVP is used.
9. Enzymatically activated macrophages and/or NK cells obtained by treating the cells with at least one of the enzymes pancreatin, bromelain, papain, lipase, amylase, trypsin and/or chymotrypsin.
10. Medication for the activation of macrophages and/or NK cells containing at least one of the enzymes in accordance with claims 1-8.

This Page Blank (uspto)

European Patent  
Office

Application number  
EP 89 11 8625

## EUROPEAN SEARCH REPORT

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant claims	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.)
A	RED LIST, 1986, No. 85074, Wobe-Mugos ---		A 61 K 37/54
A	RED LIST, 1986, No. 85075, Wobe-Mugos ---		
D	RED LIST, 1986, No. 41001, Wobenzym ---		
D	EP-A-0 309 602 (MUCOS) ---		
<hr/>			
The present search report was provided for all patent claims.			
Site of search The HAGUE	Date of completion of search 01/30/1990	Examiner TURMO Y BLANCO, C.E.	
<hr/>			
<b>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</b>			
X: Particularly relevant if taken alone	P: Intermediate document		
Y: Particularly relevant if combined with another document of the same category	T: Theory or principle underlying the invention		
A: Technological background	D: Document cited in the application		
O: Non-written disclosure	L: Document cited for other reasons		
E: Earlier patent doc. but published on, or after, the filing date	& Member of same patent family, Corresponding document		

This Page Blank (uspto)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 421 021 A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **89118625.6**

(51) Int. Cl. 5: **A61K 37/54**

(22) Anmeldetag: **06.10.89**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**10.04.91 Patentblatt 91/15**

(34) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

(71) Anmelder: **MUCOS  
EMULSIONSGESELLSCHAFT m.b.H.  
Mirastrasse 17  
W-1000 Berlin 27(DE)**

(72) Erfinder: **Ransberger, Karl  
Gabriel-von-Seidl-Strasse 62  
W-8022 Grünwald(DE)  
Erfinder: Stauder, Gerhard, Dr.  
Kathi-Kobus-Steig 1  
W-8190 Wolfratshausen(DE)**

(73) Vertreter: **Patentanwälte Grünecker,  
Kinkeldey, Stockmair & Partner  
Maximilianstrasse 58  
W-8000 München 22(DE)**

(54) Verwendung katabolischer Enzyme zur Aktivierung von Makrophagen und/oder NK-Zellen, ein diese Enzyme enthaltendes Arzneimittel sowie durch diese Enzyme aktivierte Makrophage und/oder NK-Zelle.

(57) Die Erfindung betrifft die Verwendung eines der Enzyme Pankreatin, Bromelain, Papain, Lipase, Amylase, Trypsin und/oder Chymotrypsin zur Aktivierung von Makrophagen und/oder NK-Zellen, enzymatisch aktivierte Makrophagen und/oder NK-Zellen, sowie ein Arzneimittel zur Aktivierung von Makrophagen und/oder NK-Zellen.

EP 0 421 021 A1

**VERWENDUNG KATABOLISCHER ENZYME ZUR AKTIVIERUNG VON MAKROPHAGEN UND/ODER NK-ZELLEN, EIN DIESE ENZYME ENTHALTENDES ARZNEIMITTEL SOWIE DURCH DIESE ENZYME AKTIVIERTE MAKROPHAGE UND/ODER NK-ZELLE**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung der Enzyme Pankreatin, Bromelain, Papain, Lipase, Amylase, Trypsin und/oder Chymotrypsin zur Aktivierung von Makrophagen und/oder NK-Zellen, enzymatisch aktivierte Makrophagen und/oder NK-Zellen sowie ein Arzneimittel zur Aktivierung von Makrophagen und/oder NK-Zellen.

- 5 Als Makrophagen werden mononukleäre Phagozyten (Monozyten) bezeichnet, die zu den phagozytierenden Leukozyten gehören.

NK ("natural killer")-Zellen stellen eine Subpopulation der Lymphozyten dar.

- Makrophagen und NK-Zellen kommen eine wichtige Funktion der immunologischen Überwachung sowohl gegenüber Tumorzellen als auch gegenüber Infektionen zu. So ist schon länger bekannt, daß 10 aktivierte Makrophagen und NK-Zellen auf unspezifische Weise in vitro und in vivo eine ganze Reihe von verschiedenen Tumorzellen abtöten können. Die Aktivierung der tumoriziden Effektorzellen (Makrophagen, NK-Zellen) kann mit Lymphokinen, wie Interferon und anderen Immunstimulanten erhöht werden. Interferone werden in aufwendigen und teuren Verfahren entweder aus Zellkulturen isoliert oder mit Hilfe von gentechnologischen Methoden synthetisiert.

- 15 Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen kostengünstigen, wirksamen Aktivator des tumoriziden Potentials von Effektorzellen (Makrophagen, NK-Zellen) sowie enzymatisch aktivierte Effektorzellen und ein Arzneimittel zur Aktivierung von Effektorzellen zur Verfügung zu stellen.

- Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß zur Aktivierung von Makrophagen und/oder NK-Zellen mindestens eines der Enzyme Pankreatin, Bromelain, Papain, Lipase, Amylase, Trypsin und/oder 20 Chymotrypsin verwendet wird.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß die Enzyme Pankreatin, Bromelain, Papain, Lipase, Amylase, Trypsin und/oder Chymotrypsin Makrophagen und/oder NK-Zellen hocheffizient und in extrem kurzer Zeit (innerhalb von 5 - 10 Minuten) aktivieren können.

- 25 Die erfindungsgemäß verwendeten Enzyme lassen sich kostengünstig aus den folgenden Rohmaterialien isolieren.

Pankreatin wird aus Schweine- oder Rinderpankreas gewonnen.

Bromelain ist ein proteolytisch wirksames Enzym aus dem Preßsaft der Ananas.

Papain ist ein proteolytisches Enzym, das aus dem Milchsaft der unreifen, fleischigen Früchte des Melonenbaums *Carica papaya* gewonnen wird.

- 30 Lipasen gehören zu der Untergruppe der Esterasen und werden aus Pankreas oder dem Pilz *Rhizopus arrhizus* gewonnen.

Amylasen sind Glykosid-spaltende Enzyme, die beispielsweise aus Pankreas oder speziellen Mikroorganismen isoliert werden.

- 35 Trypsin und Chymotrypsin sind proteolytische Enzyme, die ebenfalls im Pankreas gebildet werden und in Verbindung mit anderen Enzymen bereits therapeutisch eingesetzt wurden.

Vorzugsweise wird als Lipase Triacylglycerollipase und/oder als Amylase  $\alpha$ -Amylase verwendet. Diese zeigen eine gute Wirkung als Aktivator des tumoriziden Potentials von Makrophagen und/oder NK-Zellen.

- 40 Eine besondere Wirksamkeit zeigt sich bei Verwendung einer Kombination der Enzyme Pankreatin, Bromelain, Papain, Triacylglycerollipase,  $\alpha$ -Amylase, Trypsin und/oder Chymotrypsin. Neben der bemerkenswerten und unerwarteten Wirkung dieser Enzyme auf die Aktivierung des tumoriziden Potentials von Makrophagen und/oder NK-Zellen zeigt die kombinierte Verwendung der genannten Enzyme weiterhin einen synergistischen Effekt.

Weiterhin kann vorzugsweise zusätzlich Rutosid, ein zu den Flavonoiden gehörendes Glykosid, verwendet werden.

- 45 Eine besonders gute Verträglichkeit und Wirksamkeit hat die kombinierte Verwendung von 50 - 200 mg, vorzugsweise 100 mg Pankreatin, 20 - 100 mg, vorzugsweise 45 mg Bromelain, 40 - 100 mg, vorzugsweise 60 mg Papain, 5 - 50 mg, vorzugsweise 10 mg Triacylglycerollipase, 5 - 50 mg, vorzugsweise 10 mg  $\alpha$ -Amylase, 10 - 30 mg, vorzugsweise 24 mg Trypsin, 1 - 10 mg, vorzugsweise 1 mg Chymotrypsin und 10 - 100 mg, vorzugsweise 50 mg Rutosid x 3H<sub>2</sub>O pro Dosiseinheit.

- 50 Weiterhin können die zu verwendenden Präparate zusätzlich *Serratia*-Peptidase enthalten. *Serratia*-Peptidase kann aus einem Mikroorganismus der Gattung *Serratia* gewonnen werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungform wird zusätzlich noch Polyethylenglykol (PEG) und/oder Polyvinylpyrrolidon (PVP) verwendet. Hierdurch läßt sich die Aktivität von Effektorzellen zusätzlich

steigern.

Das zur Anwendung kommende Präparat kann weiterhin übliche Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthalten.

- Die durch Behandeln der Effektorzellen mit mindestens einem der Enzyme Pankreatin, Bromelain, Papain, Lipase, Amylase, Trypsin und/oder Chymotrypsin erhältlichen enzymatisch aktivierte Makrophagen und/oder NK-Zellen können zur Behandlung von Tumoren in den Patienten injiziert werden. Es hat sich nämlich überraschenderweise gezeigt, daß der enzymatisch aktivierte Zustand der Effektorzellen nach Einfrieren und späterem Auftauen derselben erhalten bleibt. Es ist hierbei von Vorteil, wenn die enzymatisch behandelten Effektorzellen vor dem Einfrieren oder der Injizierung mindestens 20 Minuten, bevorzugt mindestens 30 Minuten regenerieren können.

- 10 Die Beispiele erläutern die Erfindung.

### I. Aktivierung von Makrophagen

- 15 Bei der Untersuchung der Wirkung von Enzymen und Enzymgemischen auf die Aktivität von Makrophagen wurden die folgenden Parameter bestimmt:

- a) (PR %) Relative Phagozytoserate (in %) bezeichnet den in der gewählten, standardisierten Versuchsanordnung von Makrophagen/Monozyten phagozytierten prozentuellen Anteil der vorgelegten Zielzellen, d.h. der  $^{51}\text{Cr}$ -beladenen Schafserthrozyten (SRBC).
- 20 Die Berechnung erfolgt im  $^{51}\text{Cr}$ -Phagozytosestest - in weitgehender Analogie zur Berechnung der spezifischen Lyse im  $^{51}\text{Cr}$ -Release-Cytotoxizitätstest - nach der Formel:  
Relative Phagozytoserate (in %) =

$$\frac{\text{cpm(Probe)} - \text{cpm(negative Kontrolle)}}{\text{cpm(total)} - \text{cpm(Leerwert)}}$$

- 30 b) (dPR %) Relative Erhöhung der Phagozytoserate (in %) bezeichnet die prozentuelle Steigerung der Phagozytoserate durch Enzyme vorbehandelter gegenüber unbehandelten Monozyten/Makrophagen.

- c) (PI) Phagozytoseindex bezeichnet den pro 100 Monozyten/Makrophagen phagozytierten Anteil von Zielzellen ( $^{51}\text{Cr}$ -markierten SRBC) innerhalb einer Probe (Vertiefung in der 96er Mikrotitrationsplatte). Zur Berechnung des Phagozytoseindex muß neben der Phagozytoserate die Anzahl der SRBC in einer Probenvertiefung und die Zahl der Monozyten/Makrophagen in dieser Vertiefung oder zumindest das Verhältnis von SRBC von Monozyten/Makrophagen, d.h. von Target (T)- und Effektor (E)-Zellen bekannt sein. Dann gilt:

$$\text{PI} = \frac{T}{E} \times \text{PR \%} \times 100 =$$

$$\frac{\text{Zahl der SRBC je Vertiefung}}{\text{Zahl der Makrophagen je Vertiefung}} \times \text{PR \%} \times 100$$

- 50 d) (dPI) Veränderung des Phagozytoseindex bezeichnet die Anzahl von SRBC einer Probe, die pro 100 Monozyten im Durchschnitt mehr (oder weniger) phagozytiert werden, wenn die Monozyten mit Enzymen vorbehandelt waren, gemessen an derjenigen von 100 Monozyten phagozytierten SRBC-Anzahl im Basismedium (ohne Enzym).

- dPI = PI(vorbehandelt) - PI(unbehandelt)
- 55 e) (f) Faktor der Phagozytoseänderung bezeichnet den Quotienten der Phagozytoseraten vorbehandelter und unbehandelter Proben.

PR % (vorbehandelt)

$$f = \frac{\text{PR \% (vorbehandelt)}}{\text{PR \% (unbehandelt)}} =$$

PR % (unbehandelt)

5

cpm (vorbehandelt) - cpm (negative Kontrolle)

$$-----$$

10

cpm (unbehandelt) - cpm (negative Kontrolle)

15 1. Aktivierung von Makrophagen durch ein Enzymgemisch (Wobenzym)

Wobenzym ist ein Enzymgemisch mit der folgenden Zusammensetzung (Gewichtsteile) Pankreatin (100), Bromelain (45), Papain (60), Triacylglycerollipase (10),  $\alpha$ -Amylase (10), Trypsin (24) und Chymotrypsin (1). Zusätzlich enthält das Enzymgemisch noch 50 Gewichtsteile Rutosid x 3H<sub>2</sub>O.

20

a) Zehnfache Plasmakonzentration ( $10 \times C_{PI}$ )

Versuchsreihe I (Versuchsbedingungen: Erholungszeit: 30 min, Enzymeinwirkungsdauer: 10 min, Vortzentrifugation (VZ) : 3 min/50 g, E : T-Verhältnis: 1:1-20)

Der mittlere PR %-Wert lag bei Proben ohne Enzymbehandlung bei 10,3 und bei Proben mit enzymatischer Vorbehandlung bei 14,7. Die entsprechenden PI-Werte lagen bei 92,5 und 129,4. Somit brachte die Makrophagen-Vorbehandlung mit Wobenzym eine durchschnittliche Verbesserung des dPI-Wertes um 36,9. Der f-Wert betrug 2,21.

30

Versuchsreihe II (Versuchsbedingungen: bei Versuchsreihe I, nur E : T = 1 : 20-40)

Hier lag der PR %-Wert unbehandelter Proben bei 2,8 und jener der enzym-vorbehandelten Proben bei 7,6. Entsprechende PI-Werte waren 95,2 und 258,4. Dementsprechend erhöhte sich der dPI-Wert um 163,2. Der f-Wert lag bei 2,75.

Versuchsreihe III (Versuchsbedingungen: wie bei Versuchsreihe I, nur E : T = 1:40)

Die unbehandelten Proben wiesen einen PR %-Faktor von 2,4, die enzym-behandelten einen von 4,6 auf, die entsprechenden PI-Werte errechneten sich zu 161,7 bzw. 282,9. Somit brachte die Wobenzym-Behandlung einen dPI-Anstieg um 121,2. Der f-Wert machte im Schnitt 1,75 aus.

40

b) Einfache Plasmakonzentration ( $C_{PI}$ )

Versuchsreihe I (Versuchsbedingungen: Erholungszeit: 30 min, Enzymeinwirkungsdauer: 10 min, Vortzentrifugation: 5 min/ 50 g - 3 min/80 g, E : T-Verhältnis: 1:1 - 1:40, tz.v = 90)

Der PR %-Wert betrug nach 6maliger Wiederholung des gleichen Versuches im Durchschnitt 4,4 im Vergleich zu 2,5 in Abwesenheit von Enzymen. Die entsprechenden PI-Werte lagen bei 138,8 bzw. 111,3. Somit führte die Vorbehandlung der Makrophagen mit Wobenzym zu einem durchschnittlichen dPI-Anstieg um 27,5.

Versuchsreihe II (Versuchsbedingungen: wie bei Versuchsreihe I, nur tz.v = 150)

Die 7mal wiederholten Versuche ergaben bei Wobenzymvorbehandelten Makrophagen einen mittleren PR %-Wert von 13,2 und einen PI-Mittelwert von 390,6. Die entsprechenden Mittelwerte unbehandelter Proben betrugen 10,8 und 271,0. Die durchschnittliche dPI-Zunahme nach der Enzymbehandlung lag bei 119,6, der f-Index bei 1,53.

Versuchsreihe III (Versuchsbedingungen: wie bei Versuchsreihe I, nur tz.v = 250)

Das Ergebnis auf fünf Einzelversuchen ergab, daß Wobenzym den dPI-Index um durchschnittlich 17,4 steigen ließ. Die PI-Werte unbehandelter Proben lagen im Schnitt bei 524,5 und bei enzymatisch vorbehandelten Proben bei 541,9. Die entsprechenden PR %-Werte betrugen 19,0 und 19,7.

Die Aktivität der Makrophagen konnte zusätzlich gesteigert werden, wenn dem Kulturmedium neben Wobenzym noch PEG und/ der PVP zugesetzt wurden.

## Versuchsreihe IV

In einer aus 6 Einzelversuchen bestehenden Versuchsserie konnte eine durchschnittliche dPI-Zunahme von 148,9 als Resultante des PI-Anstiegs von 134,5 auf 283,4 nach kombinierter Wobenzym/PEG-PVP-Vorbehandlung beobachtet werden. Der PR %-Wert stieg nach der kombinierten Wobenzym/PEG-PVP-Vorbehandlung von 3,8 auf 7,9.

## Versuchsreihe V

Nach einer aus 9 Einzelversuchen bestehenden Versuchsserie, bei der Makrophagen teils mit Wobenzym allein, teils mit der Kombination von PEG-PVP und Wobenzym vorbehandelt worden, nahm der dPI-Wert um durchschnittlich 108,7 zu.

## Versuchsreihe VI

In einer weiteren aus 18 Einzelversuchen zusammengesetzten Versuchsserie konnte die Makrophagen-Vorbehandlung mit Proteasen und Lipasen des Enzympräparates Wobenzym ( $C_{PI}$ ) eine durchschnittliche dPI-Zunahme um 60,2 erwirken. Der PI-Mittelwert für die unbehandelten Proben lag bei 288,2 und jene für enzymbehandelte bei 348,4. Die entsprechenden PR %-Werte betrugen 12,8 und 9,9.

Die statistische Bearbeitung der PR %-, der PI-, der dPI und der f-Werte, gewonnen in 48 Einzelversuchen mit je 3-4, in einigen Fällen 2 Parallelen, ergab, daß die Vorbehandlung der Monozyten/Makrophagen mit Wobenzym allein ( $C_{PI}$ ) oder mit der Kombination von Wobenzym ( $C_{PI}$ ) und PEG-PVP (2-20 g/l PEG mit MG 6kD bzw. 1-10 g/l PVP mit MG 40KD bzw.  $1 \times 10^{-3}$  -  $1 \times 10^{-4}$  g/l PVP mit MG 360kD) zum durchschnittlichen PR %-Anstieg von 8,4 (bei unbehandelten Proben) auf 11,5 (nach Makrophagenbehandlung) führt. Die entsprechenden PI-Mittelwerte betrugen 238,1 (bei unbehandelten Proben) bzw. 319,8 (bei vorbehandelten Proben). Der dPI-Wert lag im Durchschnitt bei 81,5, der f-Wert lag bei 1,90.

2. Die Effizienz von Hydrolasen (Wobenzym) in kombinierter Verwendung mit PEG und PVP

In je 2 parallelen Versuchsserien (Versuchsreihen XI - XIV) wurde unter ansonsten konstanten Versuchsbedingungen die Effizienz der Makrophagen-Vorbehandlung mit Wobenzym allein ( $C_{PI}$ ) jener nach kombinierter, d.h. PEG-PVP-unterstützter, enzymatischer Makrophagen-Vorbehandlung gegenüber gestellt.

Die ersten 2 parallelen Versuchsserien (Versuchsreihen XI und XII) unterschieden sich von den beiden anderen (Versuchsreihen XIII und XIV) nur darin, daß tz.v im ersten Fall 150 und im letzteren Fall 250 betrug. Die übrigen Versuchsbedingungen waren konstant (E-T-Vorzentrifugierung: 5 min/50 g, Regenerierungszeit: 30 min).

Ein direkter Vergleich der PR %-, der PI- und der dPI-Werte zwischen Versuchsreihe XI und XII (tz.v = 150) sowie zwischen Versuchsreihe XIII und XIV (tz.v = 250) vermittelt ein Bild über die potenzierende Wirkung von PEG und PVP auf die Monozyten/Makrophagen-Aktivierung durch Hydrolasen (Wobenzym).

So stieg der durchschnittliche PI-Wert bei alleiniger Wobenzymbehandlung von 271,0 (unbehandelt) auf 390,6 (behandelt), entsprechend einem dPI-Wert von 119,6, während der entsprechende PI-Wert bei kombinierter Makrophagen-Vorbehandlung von 224,4 auf 517,0 "sprang", was einem dPI-Wert von 292,6 entspricht.

Der PR %-Wert nahm bei alleiniger Wobenzymbehandlung von 10,8 (unbehandelt) bis 15,2 (behandelt) zu; bei kombinierter Vorbehandlung verändert er sich von 5,1 auf 11,7.

Diese Ergebnisse beziehen sich auf tz.v = 150 (Versuchsreihen XI und XII). Bei tz.v = 250 (Versuchsreihen XIII und XIV) fiel der Vergleich zwischen einfacher und kombinierter Wobenzym-Vorbehandlung wie folgt aus:

Der durchschnittliche PI-Wertstieg bei alleiniger Wobenzymbehandlung von 524,5 (unbehandelt) auf 514,9 (behandelt) an, entsprechend einem dPI-Wert von 17,3. Bei der mit PEG- bzw. PVP-kombinierten Vorbehandlung dagegen nahm der dPI-Wert um 134,8 Einheiten (von 173,2 auf 308,1) zu. Die PR %-Werte stiegen in Abwesenheit von PEG bzw. PVP von 19,0 - 19,7 und in deren Anwesenheit von 6,4 - 11,5 an.

3. Aktivierung der Makrophagen durch Trypsin ( $C_{PI}$ )

Die Versuchsbedingungen entsprachen jenem bei Wobenzym (Erholungszeit: 30 min, Enzymeinwirkungsdauer: 10 min, Vorzentrifugation: 3 min/50 g). Variiert wurde in erster Linie das Verhältnis zwischen Effektorzellen (Makrophagen) und Zielzellen ( $^{51}\text{Cr}$ -beladenen SRBC), d.h das E : T-Verhältnis.

5

4. E : T-Verhältnis: 1:1-10

Der PR %-Wert, d.h. die "relative Phagozytoserate" (in %) veränderte sich im Schnitt von ~ 11,1 auf 13,4 als Folge der Makrophagen-Vorbehandlung mit Trypsin (Cl<sub>p</sub>).

10

Der PI-Wert, d.h. die pro 100 Monozyten insgesamt phagozytierte Anzahl an SRBC innerhalb einer Probe, nahm in gleicher Zeit von 92,5 auf 111,9 zu. Der dPI-Wert stieg somit um 19,5 Einheiten. Der Faktor f, entsprechend dem Quotienten aus der Phagozytoserate der behandelten und unbehandelten Probe, lag bei 1,43.

15

E : T-Verhältnis: 1:10-20

Die Trypsinbehandlung der Makrophagen führte zum Anstieg der "relativen Phagozytoserate" (PR %) von 17,9 auf 24,2 und zur Zunahme des Phagozytose-Index (PI) von 233,3 (unbehandelt) auf 316,1 (behandelt).

Der dPI-Wert wies einen Mittelwert von 82,8 und der Phagozytoseänderungsfaktor f einen solchen von 1,32 auf.

25

E : T-Verhältnis: 1:40-80

Dieser 7 Einzelversuche mit 26 Parallelen umfassende Komplex zeigte folgende Tendenzen: PR % stieg von 4,76 auf 5,3 und PI von 204,9 auf 225,5 an. Der Phagozytose-Index veränderte sich um 20,6 und der Faktor f wies im Schnitt einen Wert von 1,24 auf.

30

E : T-Verhältnis: 1:80

Der 4mal (mit 15 Parallelen) durchgeführte Versuch zeigte ähnlichen Trend wie die Versuchsreihen zuvor: PR % stieg mäßig von 3,1 auf 3,7 nach Trypsin-Behandlung. In gleicher Zeit erhöhte sich der Phagozytose-Index von 275,1 (ohne Vorbehandlung) auf 325,5. Der Faktor f betrug 1,19, der mittlere dPI-Index 50,4. /

40

E : T-Verhältnis: 1:1-80

Die Zusammenfassung von 18 Versuchen (mit 68 Parallelen) ohne nähere Spezifikation des E : T-Verhältnisses resultiert in einem Anstieg des PR %-Mittelwertes von 8,0 (vor Behandlung) auf 9,9 (nach Behandlung), in einer PI-Zunahme von 200,3 auf 237,6 sowie in einem Mittelwert für dPI von 37,2 sowie für f von 1,28.

50

5. Einhaltung einer obligaten Regenerierungszeit von wenigstens 20, bevorzugt 30 Minuten bei der in vitro Aktivierung von Makrophagen durch Hydrolasen, demonstriert am Beispiel des Trypsins (Cl<sub>p</sub>)

55

Im folgenden Versuch wurde die Einhaltung bzw. Nicht-Einhaltung einer Regenerierungszeit von 30 min nach Enzymbehandlung untersucht. Wurde keine Regenerierungszeit eingehalten, so fiel die mittlere "relative Phagozytoserate" (PR %) von 8,3 auf 7,9. Auch der gemittelte PI nahm von 252,7 auf 219,2 ab. Somit fiel der dPI-Index negativ aus (-33,5) und der f-Faktor lag bei 0,86. Wenn man allerdings unter sonst gleichen Versuchsbedingungen eine Regenerierungszeit von 30 min einhielt, ergab sich dagegen eine Änderung der PR % nach Trypsinbehandlung von 7,9 auf 9,9, das IP von 200,2 auf 237,6, dPI zeigte einen Mittelwert von 37,3 und der f-Faktor lag bei 1,28.

6. Makrophagen-Aktivierung durch Papain

Es wurden zwei Papain-Konzentrationen getestet, die  $C_{PI}$  und ihr 10faches. Der ersten Versuchsserie wurde Papain in der  $C_{PI}$ -Konzentration untersucht. Die Papain-vorbehandelten Makrophagen wiesen einen PR %-Mittelwert von 11,3 und einen PI-Mittelwert von 165,9 auf. Die unbehandelten Makrophagen zeigten dagegen einen niedrigeren PR %-Mittelwert von 7,5 und einen PI-Mittelwert von 164,6.

Die 10fach höhere Papain-Konzentration bewirkte einen mittleren PR %-Anstieg von 2,9 auf 5,4 und eine PI-Verschiebung von 139,0 auf 265,3. Der dPI-Mittelwert lag bei 196,2 und der f-Mittelwert bei 1,85.

10

7. Aktivierung der Effektorzellen (Makrophagen) durch Lipase

Die Versuchsbedingungen waren gleich wie bei den anderen Enzymen. In einer Versuchsserie, bestehend aus 8 Einzelversuchen (mit 29 Parallelen), ergab die Vorbehandlung der Makrophagen mit der therapeutisch erzielbaren Lipase-Konzentration ( $C_{PI}$ ) eine Steigerung der phagozytischen Aktivität von Makrophagen, die sich in folgenden (gemittelten) Kennzahlen äußerte: Die relative Phagozytoserate (PR %) stieg von 10,3 bei unbehandelten auf 12,3 bei Lipase-vorbehandelten Proben an. Der Phagozytoseindex (PI) erhöhte sich von 258,8 auf 316,8 Einheiten. Der dPI-Mittelwert errechnete sich zu 58,0 und der f-Mittelwert lag im Durchschnitt bei 1,24.

In einer weiteren Serie von 8 Einzelversuchen, bei denen die Lipase zum Teil auch mit PEG (MG 6kD, 40 g/l) und PVP (MG 360kD, 0,1 - 10 mg/l) kombiniert wurde, erhöhte sich die relative Phagozytoserate nach der Enzymbehandlung von 16,6 auf 20,4 und der Phagozytose-Index von 329,9 auf 411,2. Der entsprechende dPI-Mittelwert lag bei 59,0 und der gemittelte f-Wert bei 1,24.

Die zusammenfassende Darstellung von 26 Einzelversuchen (mit 76 Parallelen) ergab im Durchschnitt eine PR %-Steigerung von 10,1 auf 12,8 (im Extremfall von 3,0 auf 13,2) und eine durchschnittliche PI-Zunahme von 230,1 auf 296,3 (im Extremfall von 75,0 auf 330,0). Der dPI-Mittelwert lag bei 66,3 (Höchstwert: 255,0) und der f-Mittelwert bei 1,35 (Höchstwert: 4,37).

30 8. Synergismus der einzelnen Hydrolasen (Proteasen und Lipasen)

Überraschenderweise wurde eine synergistischen Wirkung des Hydrolasen-Gemisches Wobenzym gefunden. Im folgenden wurde die Wirkung einzelner Vertreter der tierischen und pflanzlichen Proteasen sowie Lipase der Wirkung des Enzympräparates gegenübergestellt.

35

a) Vergleich von Trypsin ( $C_{PI}$ ) mit dem Enzympräparat ( $C_{PI}$ )

In einer 13 Einzelversuche umfassenden Versuchsserie zeigte sich, daß der durchschnittliche PR %-Wert bei Wobenzym (10,2) um 1,8 höher als bei Trypsin (8,4) lag bzw. deren Verhältnis 1,2 betrug.

Der PI-Index war bei Wobenzym (274,0) um 49,7 Einheiten höher als bei Trypsin (224,3). Im Extremfall differierten die PR %-Werte um 8,1 und der PI-Index um 281,6 Einheiten zu Gunsten des Wobenzysms.

## 45 b) Vergleich von Chymotrypsin mit dem Enzymgemisch

Eine auf 9 Einzelversuchen aufbauende Versuchsserie führte zu folgendem Ergebnis: Der Mittelwert der "relativen Phagozytoserate" lag beim Wobenzym (12,2) um 2,4 Einheiten höher als beim Chymotrypsin (9,8); der "Phagozytose-Index" wies beim Wobenzym (264,0) einen 24,8 Einheiten höheren Mittelwert als beim Chymotrypsin (239,2) auf. Das Verhältnis beider PR %-Werte lag bei 1,26 zu Gunsten des Wobenzysms.

Im Extremfall unterschieden sich die PR %-Werte um 13,1 und die PI-Werte gar um 170,3 zu Gunsten des Enzymgemisches.

55

## c) Vergleich von Papain mit dem Enzymgemisch

Auch bei diesem Vergleich wies Wobenzym eine höhere PR %-Aktivität als Papain auf (19,5 versus

14,8)

Auch die PI-Werte lagen bei Wobenzym höher (311,2 versus 269,0).

5 d) Vergleich der Lipase mit dem Enzymgemisch

In einer 5 Einzelversuche umfassenden Vergleichsserie wies Wobenzym mit einem PR %-Mittelwert von 11,5 eine um 2,5 Einheiten höhere phagozytose-steigernde Aktivität als Lipase (9,0) auf. Ähnlich gilt für die PI-Mittelwerte (292,3 versus 275,6).

10 Die gleichzeitige Untersuchung von (a) Trypsin (b) Chymotrypsin und (c) Wobenzym (alle: Gav, in einer aus 9 Einzelversuchen bestehenden Vergleichsserie resultierte in folgenden Mittelwert für die aktivitätsrelevanten Kennzahlen PR %, PI und f:

- (a) Trypsin: PR % 10,2, PI 215,1 und f 1,37
- (b) Chymotrypsin: PR % 9,9, PI 239,2 und f 1,46 sowie
- (c) Wobenzym: PR % 12,2, PI 264,0 und f 1,74.

15 Die entsprechenden PR %- und PI-Mittelwerte der unbehandelten Referenzproben betrugen 7,9 und 171,9 (f 1,0).

20 II. Steigerung der Aktivität von NK-Zellen durch Hydrolasen (proteolytische Enzyme tierischen und pflanzlichen Ursprungs, Lipase)

Die cytotoxische/cytolytische Aktivität von NK-Zellen wurde im  $^{51}\text{Cr}$ -Release-Test quantitativ erfaßt. Als Zielzellen (T) dienten K562-Lymphomzellen, die besonders empfindlich und gewissermaßen selektiv für 25 (aktivierte) NK-Zellen sind.

Im folgenden werden die gemessenen Parameter erläutert:

a) (LR %) Lyserate bezeichnet mathematisch die prozentuale Zytotoxizität und wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$30 \quad LR = \frac{cpm(\text{Probe}) - cpm(\text{negative Kontrolle})}{cpm(\text{total}) - cpm(\text{negative Kontrolle})} \times 100 \quad (\%)$$

35 b) (LI %) Lyseindex bezeichnet die Anzahl der K562-Zellen, die von je 100 NK-Zellen lysiert werden in %.

$$40 \quad LI = \frac{\text{Anzahl der K653 - Zellen (Probe)}}{\text{Anzahl der NK-Zellen (Probe)}} \times \text{Lyserate(in \%)} \times 100$$

45 c) (dLR) Änderung der Lyserate bezeichnet die Differenz der Lyseraten (LR) zwischen Enzym-behandelten und nicht behandelten Proben. Der Referenzwert ist demnach die NK-Aktivität im Basismedium, d.h. ohne Enzym und/oder PEG-PVP-Zusatz.

50 1. NK-Aktivierung unter Einhaltung einer Regenerierungszeit

Die Vorbehandlung der NK-Zellen (10 min bei 37°C) mit dem Enzymgemisch (Wobenzym) bei der therapeutisch erzielbaren Plasmakonzentration ( $C_P$ ) zeigte zwar bei verschiedenen Testpersonen stark differierende Absolutwerte für die "Lyserate" (LR), für den Lyseindex (LI) sowie für die Änderung der Lyserate nach Enzymbehandlung (dLR), der Trend zur enzym-vermittelten NK-Aktivierung ist jedoch klar ausgeprägt.

In einer aus 26 Einzelversuchen bestehenden Versuchsserie zeigte sich nur in einem Fall eine Aktivitätsabnahme nach Wobenzym-Behandlung.

Um ein genaueres Bild vor allem auch hinsichtlich der beachtlichen interindividuellen Schwankungen zu

vermitteln, seien die LR-, die LI- und die dLR-Werte dieser repräsentativen Versuchsserie einzeln aufgeführt. So änderte sich der LR-Wert von Proband zu Proband entsprechend den Zahlenpaaren links und rechts des Trennstrichs (links: unbehandelte Proben, rechts: enzym-vorbehandelte Proben): 3,0/3,5; 3,0/4,9; 3,1/20,0; 3,1/47,4; 6,2/8,0; 6,2/8,9; 12,3/13,4; 12,3/36,1; 14,1/16,5; 14,1/42,4; 2,9/11,0; 8,5/12,1; 10,4/19,3; 5 20,8/21,3; 30,2/44,6; 25,2/26,5; 0,9/12,6; 5,7/31,3; 7,8/25,2; 18,4/25,5; 25,7/37,0; 25,1/25,7; 19,2/17,7; 22,1/23,6; 23,7/24,1; 23,1/24,3.

Die entsprechenden LI-Werte änderten sich von Proband zu Proband wie folgt (links: unbehandelt, rechts: enzym-vorbehandelt): 60/71; 60/98; 62/401; 62/948; 124/160; 124/178; 246/267; 246/721; 282/330; 282/849; 57/219; 170/241; 207/387; 416/425; 603/892; 503/530; 17/252; 115/626; 157/505; 368/511; 514/739; 10 502/513; 384/354; 442/473; 474/482; 462/485.

die hieraus berechneten dLI-Werte waren: 11; 38; 339; 886; 36; 54; 21; 475; 48; 567; 162; 71; 180; 9; 289; 27; 235; 511; 348; 143; 225; 11; 31; 8; 23.

#### 15 2. Behandlung der NK-Zellen mit dem Enzymgemisch Wobenzym unter keiner Einhaltung einer Regenerierungszeit

Die Werte werden bei diesen Untersuchungen meistens negativ. LR bewegte sich von 0,7/3,3 - 18,7/7,2. die Werte für LI lagen zwischen 14/67 und 431/233, für die dLI zwischen 53 und -229. Die Ergebnisse machen die Wichtigkeit einer Regenerierungszeit für die Zellen deutlich.

#### 3. Aktivierung der NK-Zellen durch Trypsin

25 Trypsin erwies sich als eine der aktivsten Komponenten des Hydrolasengemisches. Um die eindeutige Wirkung, aber auch die großen interindividuellen Schwankungen, die sowohl die Basisaktivität als auch die enzym-vermittelte Aktivierbarkeit der NK-Zellen betreffen, aufzuzeigen, sollen die Ergebnisse einer aus 28 Einzelversuchen aufbauenden Versuchsserie einzeln aufgelistet werden. Wie oben bei Wobenzym sollen die LR-, die LI- und die dLI-Werte wiedergegeben werden. Auch hier steht die Zahl links vom Trennstrich für die unbehandelte und jene rechts von diesem Querstrich für enzym-vorbehandelte Proben.

Die LR-Werte waren: 7,6/12,8; 3,0/3,6; 7,6/18,8; 3,0/7,6; 3,1/32,6; 6,2/12,4; 3,1/32,6; 6,2/12,4; 12,3/25,9; 6,2/12,9; 12,3/26,4; 14,1/36,3; 17,3/17,8; 14,1/37,6; 25,4/27,1; 21,3/22,9; 22,8/23,8; 25,3/27,8; 22,6/26,6; 42,2/26,6; 30,3/31,9; 13,0/17,5; 20,2/24,1; 20,6/26,4; 24,5/21,4; 30,4/32,3; 23,3/27,1; 27,5/30,9; 26,6/31,8.

30 Die entsprechenden LI-Werte änderten sich von Proband zu Proband wie folgt: 155/256; 60/72; 155/377; 60/152; 62/651; 124/249; 62/239; 124/259; 246/517; 282/727; 246/538; 282/752; 345/355; 508/542; 425/458; 455/476; 505/556; 452/533; 483/533; 605/637; 260/350; 404/483; 413/527; 490/429; 608/646; 456/541; 549/619; 532/635.

35 Die dLI-Werte nahmen folgende Werte an: 101; 12; 222; 92; 589; 125; 177; 135; 271; 445; 292; 470; 10; 34; 33; 21; 51; 81; 50; 32; 90; 79; 114; -61; 38; 76; 70; 70; 103.

40

#### 4. Wirkung von Chymotrypsin auf die Aktivität von NK-Zellen

Auch bei Chymotrypsin zeigte sich die gleiche Wirkung wie bei Wobenzym und Trypsin. Es zeigte sich 45 immer eine Steigerung der NK-Aktivität, solange die obligate Erholungszeit unmittelbar nach der Enzymbehandlung eingehalten wurde.

Bei einem typischen Experiment, das auf 6 Einzelversuchen aufbaute, bewegten sich die Wertepaare für die "Lyserate" (LR) zwischen 6,2/9,2 und 3,1/17,5 jene für die "Lyserate" (LR) zwischen 124/185 und 62/349 und die dLR-Werte zwischen 61 und 287.

50

#### 5. Steigerung der NK-Aktivität durch Papain

Auch bei NK-Zellen, die mit dem pflanzlichen Proteas Papain vorbehandelt worden sind, zeigte sich 55 eine klare Aktivitätssteigerung.

Dies soll am Beispiel einer repräsentativen Versuchsserie, die auf 8 Einzelversuchen basierte, demonstriert werden.

Die LR-Wertpaare bewegen sich von Proband zu Proband variierend von 0,7/1,9 - 14,1/45,7, die

entsprechenden LI-Wertpaare lagen zwischen 14/37 und 282/915 und die dLI-Werte streuten zwischen 23 und 633.

5    6. Steigerung der Aktivität von NK-Zellen durch Lipase

Der Einfluß der im Wobenzym enthaltenen Lipase auf die NK-Aktivität wird am Beispiel einer aus 32 Einzelversuchen bestehenden Versuchsserie demonstriert. Es zeigte sich, daß eine kleine Wirkung auf die Aktivität von NK-Zellen besteht, daß jedoch auf die interindividuellen Schwankungen sowohl der Basisaktivität als auch der Lipase-vermittelten Aktivierung von NK-Zellen beachtlich sind. Nur in 3 von 32 Fällen ergaben sich für dLI negative Werte.

Die Aufschlüsselung nach den Aktivierungskennzahlen LR, LI und dLI sowie die Schreibweise bei den LR- und LI-Wertpaaren (links: unbehandelt, rechts: Lipase-vorbehandelt) entsprechen jenen bei den oben besprochenen Enzymen.

15    LR ("Lyserate") : 2,2/3,1; 5,7/7,1; 4,6/7,1; 4,3/5,5; 2,4/7,3; 5,9/7,2; 7,1/7,2; 5,7/6,4; 4,3/9,6; 1,9/1,4; 5,2/6,4; 3,4/5,4; 4,7/5,2; 4,2/7,0; 5,8//5; 6,5/6,5; 6,1/7,5; 7,0/11,0; 19,2/17,0; 22,1/23,6; 23,7/24,1; 23,1/23,4; 6,2/8,4; 6,2/7,1; 12,3/26,3; 12,3/26,0; 14,1/38,2; 14,1/39,7; 14,7/15,1; 18,7/19,4; 21,6/13,9; 19,6/20,1.

16    LI ("Lyseindex") : 43/62; 115/142; 93/142; 86/109; 48/147; 118/145; 143/144; 114/128; 86/191; 38/29; 105/128; 68/109; 94/104; 83/139; 116/150; 129/131; 150/122; 140/221; 384/340; 442/471; 474/481; 462/469; 20    124/167; 124/142; 246/527; 246/521; 282/763; 282/793; 301/293; 373/387; 431/278; 401/393.

dLI ("Änderung der Lyserate") : 19; 27; 49; 23; 99; 27; 1; 14; 105; -9; 23; 41; 10; 56; 34; 2; 28; 81; -44; 29; 7; 43; 18; 281; 275; 481; 511; 8; 14; -153; 8.

III. Um die erhaltenen, in vitro enzymatisch aktivierte Effektorzellen in Tumorpatienten zu injizieren ist die Stabilität des tumoriziden Zustandes dieser Zellen von besonderer Wichtigkeit. Es wurde überraschenderweise gefunden, daß der durch enzymatische Behandlung erzielbare, aktivierte, tumorizide Zustand der Effektorzellen nach Einfrieren und späterem Auftauen derselben erhalten bleibt.

Zum Einfrieren der enzymatisch aktivierten Effektorzellen wurden die beiden Polymere PEG und PVP als Kryoprotektanten verwendet. In diesen Versuchen wurde das PEG mit MG 6kD sowie das PVP mit MG 40kD und 360 kD in einer Endkonstellation von 40 g/l zu einer 8 - 15 %igen DMSO-Lösung im RPM I 1640-30 Medium zugesetzt.

Wie aus den unten aufgeführten Kennzahlen ersichtlich ist, blieb bei dieser Mischung die Enzym-induzierte Makrophagen-Aktivierung auch nach Einfrieren und Auftauen der Makrophagen erhalten.

Die Versuchsbedingungen waren: Wobenzym (C<sub>P1</sub>), Enzymeinwirkungsdauer: 10 min, Erholungszeit: 30 min.

35    Die nach dem Auftauen der eingefrorenen, Enzym-vorbehandelten Makrophagen-Suspensionen gemessenen Aktivitäten zeigen klar, daß die Effektorzell-Aktivierung durch das Einfrieren der Zellen nicht verlorengeht. So zeigten die mit dem aus DMSO (8 - 15 %) und PEG (MG 6kD, 40 g/l) zusammengesetzten kryoprotektiven Gemisch eingefrorenen Proben PR %-Werte von 4,4 - 9,7, während die Referenzwerte zwischen 2,2 und 6,1 lagen (PR %-Vergleichswerte: 9,7/2,2, 4,4/2,6, 8,6/6,1, 6,9/2,8). Die PI-Werte bewegten sich zwischen 132,0 und 291,0, die Referenzwerte zwischen 66,0 und 146,4 (PI-Werte: 291,0/66,0, 132,0/78,0, 206,4/146,4, 200,1/81,2).

40    Die entsprechenden dPR-Werte lagen zwischen 41,0 und 340,7, die dPI-Werte zwischen 54,0 und 225,0. Die gute Konservierung der Makrophagen-Aktivität zeigte sich auch im f-Wert der zwischen 1,41 und 4,41 lag. Auf die Kombination des konventionellen Kryoprotektants DMSO mit PVP erwies sich als sehr erfolgreich bei der Konservierung der Makrophagen-Aktivität, wie sich aus dem Vergleich der PR %-Wertpaare 5,9/2,8 und 8,7/2,1 bei PVP mit MG 40kD bzw. 4,2/1,8 und 12,0/6,6 bei PVP mit MG 360 kD abgeleitet werden kann.

45    Das gleiche Ergebnis zeigt sich auch bei den PI-Wertpaaren (141,6/67,2 und 60,9/252,3 bei MG 40kD bzw. 196,0/54,0 und 300,0/165,0 bei MG 360kD), sowie bei den f-Werten (2,12 und 4,15 bei MG 40kD bzw. 50    2,34 und 1,80 bei MG 360kD)

### Ansprüche

- 55    1. Verwendung mindestens eines der Enzyme Pankreatin, Bromelain, Papain, Lipase, Amylase, Trypsin und/oder Chymotrypsin zur Aktivierung von Makrophagen und/oder NK-Zellen.  
 2. Verwendung nach Anspruch 1,  
 dadurch gekennzeichnet,

- daß als Lipase Triacylglycerollipase verwendet wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß als Amylase  $\alpha$ -Amylase verwendet wird.
- 5 4. Verwendung nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß eine Kombination der Enzyme Pankreatin, Bromelain, Papain, Triacylglycerollipase,  $\alpha$ -Amylase, Trypsin und/oder Chymotrypsin verwendet wird.
- 10 5. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-4,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß zusätzlich Rutosid verwendet wird.
6. Verwendung nach Anspruch 5,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß 50 - 200 mg, vorzugsweise 100 mg Pankreatin, 20 - 100 mg, vorzugsweise 45 mg Bromelain, 40 - 100  
15 mg, vorzugsweise 60 mg Papain, 5 - 50 mg, vorzugsweise 10 mg Triacylglycerollipase, 5 - 50 mg, vorzugsweise 10 mg  $\alpha$ -Amylase, 10 - 30 mg, vorzugsweise 24 mg Trypsin, 1 - 10 mg, vorzugsweise 1 mg Chymotrypsin und 10 - 100 mg, vorzugsweise 50 mg Rutosid  $\times 3\text{H}_2\text{O}$  pro Dosiseinheit verwendet werden.
7. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-6,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß zusätzlich Serratia-Peptidase verwendet wird.
8. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß zusätzlich PEG und/oder PVP verwendet wird.
9. Enzymatisch aktivierte Makrophagen und/oder NK-Zellen erhältlich durch Behandeln der Zellen mit  
25 mindestens einem der Enzyme Pankreatin, Bromelain, Papain, Lipase, Amylase, Trypsin und/oder Chymotrypsin.
10. Arzneimittel zur Aktivierung von Makrophagen und/ oder NK-Zellen enthaltend mindestens eines der Enzyme nach Anspruch 1 - 8.

30

35

40

45

50

55



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 11 8625

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. CL5)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	
A	ROTE LISTE, 1986, Nr. 85074, "Wobe-Mugos" ---		A 61 K 37/54
A	ROTE LISTE, 1986, Nr. 85075, "Wobe-Mugos" ---		
D	ROTE LISTE, 1986, Nr. 41001, "Wobenzym" ---		
D	EP-A-0 309 602 (MUCOS) -----		
			RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. CL5)
			A 61 K
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p>			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prefer	
DEN HAAG	30-01-1990	TURMO Y BLANCO C.E.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelde datum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			